



Dynamic Search: Equivalent Patents/Families (File 352)

Records for: JP 6239893

save as alert...

save strategy only...

Output

Format: Full Record

Output as: Browser

display/send

Modify

refine search

back to picklist

select
all none

Records 1 of 1 In full Format

☐ 1.

22

5/19/1 DIALOG(R)File 352:Derwent WPI (c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

010076329 **Image available**

WPI Acc No: 1994-344042/ 199443

Related WPI Acc No: 2003-460769

XRAM Acc No: C94-156519

Phosphorylation of tau protein or its partial peptide with phospho-enzyme I - used for diagnosis, prevention and treatment of Alzheimer's disease

Patent Assignee: MITSUBISHI KASEI CORP (MITU)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 6239893	A	19940830	JP 92177241	A	19920703	199443 B
JP 3324611	B2	20020917	JP 92177241	A	19920703	200268

Priority Applications (No Type Date): JP 92177241 A 19920703

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 6239893	A	32	C07K-013/00		
JP 3324611	B2	26	C07K-002/00		Previous Publ. patent JP 6239893

Abstract (Basic): JP 6239893 A

Phosphorylation of tau protein or its partial peptide with phospho-enzyme I, tau protein kinase I, has the following physicochemical properties: (a) activity: phosphorylated serine and threonine in tau protein with ATP as a phosphoric acid donor at ratios of upto 4 residues to 1 mole of tau protein, (b) substrate specificity: specifically phosphorylated tau protein or MAP2 of microtubule satellite protein in cerebral extract protein, (c) optimal pH: 6.5 in the absence of tubulin and 6.0 in the presence of tubulin, (d) active temp.: 37 deg.C, (e) mol.wt.: 50,000 determined by gel filtration in the presence of 0.5M NaCl, 100,000 by gel filtration of complex with tau protein in the absence of NaCl, and 45,000 with SDS-PAGE, (f) stable for at least 1 year in 25% glycerol and 0.02% of polyoxyethylene sorbitan monolaurate, pH 6.5 and at -20 deg.C, (g) not activated with known kinase activation factors of cAMP, cGMP, calmodulin, or phospholipid, and phosphorylation of tau protein is activated under the polymerisation condition of tubulin, and (h) the activity reduces to 1/2 with 90 mM of NaCl or KCl.

Phosphoenzyme I or tau protein kinase I is prepd. from tubule protein fraction by polymerisation or de-polymerisation of temp. dependent extract of mammals e.g. rat or cow, and purified by combination of various chromatography and gel filtration.

USE/ADVANTAGE - Used for diagnosis, prevention and treatment of Alzheimer diseases. (Reissue of the entry in week 9439 based on complete specification)

Dwg. 0/0

タウプロテインキナーゼ I I タウプロテインキナーゼ I
タウ蛋白質 ↓ タウ蛋白質 ↓ リン酸化タウ蛋
(脱リン酸化) → (正常にリン酸化) → (異常リン酸

Title Terms: PHOSPHORYLATED; TAU; PROTEIN; PEPTIDE; PHOSPHO; ENZYME;
DIAGNOSE; PREVENT; TREAT; DISEASE

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C07K-002/00; C07K-013/00

International Patent Class (Additional): A61K-037/56; C12N-009/12;
C12Q-001/48

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-N02; B12-K04A5; B14-J01A4; D05-A02

Chemical Fragment Codes (M1):

01 B415 B515 B615 B701 B713 B720 B815 B831 M423 M720 M903 N104 N134

N262 N281 N381 N513 P625 P831 V752

Derwent Registry Numbers: 0109-S

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2005 Thomson Derwent. All rights reserved.

©1997-2005 Dialog, a Thomson business - Version 2.5

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-239893

(43)公開日 平成6年(1994)8月30日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 0 7 K 13/00		8318-4H		
C 1 2 Q 1/48	Z N A Z	6807-4B		
// A 6 1 K 37/56	A A B	8314-4C		

審査請求 未請求 請求項の数 8 OL (全 32 頁)

(21)出願番号 特願平4-177241

(22)出願日 平成4年(1992)7月3日

(71)出願人 000005968

三菱化成株式会社

東京都千代田区丸の内二丁目5番2号

(72)発明者 石黒 幸一

東京都町田市南大谷字11号916番地の2

株式会社三菱化成生命科学研究室内

(72)発明者 佐藤 尚武

東京都町田市南大谷字11号916番地の2

株式会社三菱化成生命科学研究室内

(72)発明者 内田 庸

東京都町田市南大谷字11号916番地の2

株式会社三菱化成生命科学研究室内

(74)代理人 弁理士 長谷川 曉司

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 タウ蛋白質のリン酸化方法

(57)【要約】

【構成】 ATPをリン酸供与体として、タウ蛋白質中のセリン及びスレオニンをリン酸化し、タウ蛋白質1分子あたり8残基以下(TPKIで4残基以下、TPKIで4残基以下)のリン酸基を入れるリン酸化酵素を使用して、タウ蛋白質またはその部分ペプチドをリン酸化する方法。

【効果】 本発明のリン酸化方法は、タウ蛋白質に対し特異的に作用するものであり、アルツハイマー病およびアルツハイマー型老年痴呆の病因の解明、さらにはこれを予防または治療する薬物の探索への応用が期待される。

(2)

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記の理化学的性質を有するリン酸化酵素Ⅰの作用により、タウ蛋白質またはその部分ペプチドをリン酸化することを特徴とするタウ蛋白質のリン酸化方法。

リン酸化酵素Ⅰ

(a) 作用：ATPをリン酸供与体として、タウ蛋白質中のセリンおよびスレオニンをリン酸化し、タウ蛋白質1分子あたり4残基以下のリン酸基を導入する。

(b) 基質特異性：脳抽出液の蛋白質の中で、微小管付随蛋白質であるタウ蛋白質およびMAP 2を特異的にリン酸化する。ヒストンをリン酸化しない。 α -カゼインを少しリン酸化する。

(c) 至適pH：チューブリン非存在下での至適pHは6.5であり、チューブリン存在下での至適pHは6.0である。

(d) 作用適温：37℃

(e) 分子量：0.5M塩化ナトリウムの存在下でのゲル濾過により求めた測定値は約5万であり、塩化ナトリウム非存在下ではタウ蛋白質と複合体を作り、そのゲル濾過による測定値は約10万である。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により求めた測定値は約4万5千である。

(f) 安定性：25%グリセロールと0.02%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート中、pH6.5、温度-20℃において少なくとも一年間安定である。

(g) 活性化：既知のキナーゼの活性化因子であるcAMP、cGMP、 Ca^{2+} 、カルモジュリンおよびリン脂質等では活性化されない。チューブリンの重合条件で、タウ蛋白質のリン酸化が活性化される。

(h) 阻害：90mMのNaClまたはKClで活性が半減する。

【請求項2】 リン酸化酵素Ⅰの一次構造が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列で表されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 タウ蛋白質またはその部分ペプチドのセリンおよび/またはスレオニンが部分的にリン酸化されていることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項4】 スプライシングを受けたタウ蛋白質の一次構造が、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で表されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項5】 タウ蛋白質の部分ペプチドが、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列の141番目のセリン、173番目のスレオニン、307番目のセリンおよび324番目のセリンから選ばれる1以上のアミノ酸を含むものであり、かつ144番目のセリン、147番目のスレオニン、177番目のセリンおよび315番目のセリンから選ばれる1以上のアミノ酸が予めリン酸化されていることを特徴とする請求項1記載の方法。

2

【請求項6】 リン酸化されるタウ蛋白質またはその部分ペプチドのアミノ酸が、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列の141番目のセリン、173番目のスレオニン、307番目のセリンおよび324番目のセリンから選ばれる1以上のアミノ酸であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項7】 タウ蛋白質またはその部分ペプチドが、配列表の配列番号3~29に記載のアミノ酸配列を含有してなることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項8】 下記の理化学的性質を有するリン酸化酵素ⅠⅠでリン酸化し得る蛋白質またはペプチドを該リン酸化酵素ⅠⅠでリン酸化し、更に下記の理化学的性質を有するリン酸化酵素Ⅰの作用によりリン酸化することを特徴とする蛋白質のリン酸化方法。

リン酸化酵素ⅠⅠ

(i) 作用：ATPをリン酸供与体として、タウ蛋白質中の、C末端側の隣にプロリンのあるセリンおよびスレオニンをリン酸化し、タウ蛋白質1分子あたり4残基のリン酸基を導入する。

(j) 基質特異性：脳抽出液の蛋白質の中で、微小管付随蛋白質であるタウ蛋白質およびMAP 2を特異的にリン酸化する。ヒストンH1とニューロフィラメントHサブユニットもリン酸化する。 β -カゼインを少しリン酸化する。

(k) 至適pH：チューブリン非存在下での至適pHは6.5であり、チューブリン存在下での至適pHは6.0である。

(l) 作用適温：37℃

(m) 分子量：0.5M塩化ナトリウムの存在下でのゲル濾過により求めた測定値は約5万であり、塩化ナトリウム非存在下ではタウ蛋白質と複合体を作り、そのゲル濾過による測定値は約10万である。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により求めた測定値は約3万であり、その他に2.3万の蛋白質があり、この2種の蛋白質が結合してゲル濾過では約5万になっている。

(n) 安定性：25%グリセロールと0.02%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート中、pH6.5、温度-20℃において少なくとも一年間安定である。

(o) 活性化：既知のキナーゼの活性化因子であるcAMP、cGMP、 Ca^{2+} 、カルモジュリンおよびリン脂質等では活性化されない。チューブリンの重合条件で、タウ蛋白質のリン酸化が活性化される。

(p) 阻害：40mMのNaClまたはKClで活性が半減する。

リン酸化酵素Ⅰ

(a) 作用：ATPをリン酸供与体として、タウ蛋白質中のセリンおよびスレオニンをリン酸化し、タウ蛋白質1分子あたり4残基のリン酸基を導入する。

(b) 基質特異性：脳抽出液の蛋白質の中で、微小管付

(3)

随蛋白質であるタウ蛋白質およびMAP 2を特異的にリン酸化する。ヒストンをリン酸化しない。 α -カゼインを少しリン酸化する。

(c) 至適pH: チューブリン非存在下での至適pHは6.5であり、チューブリン存在下での至適pHは6.0である。

(d) 作用適温: 37℃

(e) 分子量: 0.5M塩化ナトリウムの存在下でのゲル濾過により求めた測定値は約5万であり、塩化ナトリウム非存在下ではタウ蛋白質と複合体を作り、そのゲル濾過による測定値は約10万である。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により求めた測定値は約4万5千である。

(f) 安定性: 25%グリセロールと0.02%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート中、pH6.5、温度-20℃において少なくとも一年間安定である。

(g) 活性化: 既知のキナーゼの活性化因子であるcAMP、cGMP、 Ca^{2+} 、カルモジュリンおよびリン脂質等では活性化されない。チューブリンの重合条件で、タウ蛋白質のリン酸化が活性化される。

(h) 阻害: 90mMのNaClまたはKClで活性が半減する。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、タウ蛋白質、その部分ペプチドまたはそれらに類似したペプチドをリン酸化酵素を触媒としてリン酸化する方法に関するものであり、タウ蛋白質のリン酸化を阻害または促進する薬剤の探索に利用できる。

【0002】

【従来の技術】アルツハイマー病は初老期(45~65才)に発病する進行性の痴呆で、病理学的にはその脳内に多数の老人斑と神経原線維変化が認められる。65才以上の老年期に発症するいわゆる自然老化による老年痴呆も、病理学的に何ら本質的な差は認められないので、アルツハイマー型老年痴呆と呼ばれている。この疾患の患者数は、高齢者人口の増加とともに増え、社会的に重要な疾患となっている。しかしこの疾患の原因は諸説あるものの結果的にはまだ不明であり、早期解明が望まれている。

【0003】アルツハイマー病およびアルツハイマー型老年痴呆に特徴的な二つの病理変化の出現量は、知能障害の程度とよく相関することが知られている。そこで、この二つの病理変化を生ずる不溶性の蓄積物質を分子レベルで解明し、この疾患の病因に到達しようという研究が1980年代の前半頃から行われてきた。この病理変化の一つである神経原線維変化は、神経細胞内にPHF(ペアード・ヘリカル・フィラメント: paired helical filament)と呼ばれる二重ラ

4

せん状の繊維状物質が蓄積してくるものである。近年、その構成成分として、脳に特異的な微小管付随タンパク質の一種であるタウ蛋白質とユビキチンが同定された

(井原ら, J. Biochem., 99, 1807-1810 (1986); Grundke-Iqbalら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4913-4917 (1986))。このうちタウ蛋白質(以下「タウ」と称することもある)は、通常SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で分子量48~65Kに数本のバンドを形成する一群の近縁タンパク質で、微小管の形成を推進することが知られている。さらに、PHF中に組み込まれたタウは、通常のタウより強くリン酸化されていることが、PHFに対するポリクローナル抗体(抗ptau抗体: 井原ら, J. Biochem., 99, 1807-1810 (1986))や、タウに対するモノクローナル抗体(tau-1抗体: Grundke-Iqbalら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 4913-4917 (1986))を用いて証明された。

【0004】本発明者らは、この異常なリン酸化を触媒する酵素を単離し、タウプロテインキナーゼIと命名した(内田ら, 生化学, 第64巻, 第5号, p. 308 (1992))。しかし、タウプロテインキナーゼIの一次構造は不明であり、またタウプロテインキナーゼIの基質となりうる条件や、リン酸化の詳細については明らかにされていないのが現状であった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、PHFの蓄積がアルツハイマー病脳でニューロンの変性、引き続いて死を誘導しているものと考え、PHFの蓄積の原因となるタウ蛋白の異常リン酸化に相当する反応を試験管内(in vitro)で遂行する方法を明らかにすることによって、アルツハイマー病の治療および予防の手段を得ようとするものであり、さらにはこうしたリン酸化の異常に起因するその他の疾患の治療および予防の手段を得ようとするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記目的を達成するためにPHFに組み込まれているリン酸化タウと同一のエピトープを持つリン酸化タウのリン酸化部位を決定し、そのリン酸化を触媒するリン酸化酵素の構造を明らかにすることによって、かかるリン酸化反応の必要条件を解明し、本発明に到達した。

【0007】即ち本発明の要旨は、下記理化学的性質を有するリン酸化酵素Iの作用により、タウ蛋白質またはその部分ペプチドをリン酸化することを特徴とするタウ蛋白質のリン酸化方法に存する。

(a) 作用: ATPをリン酸供与体として、タウ蛋白質中のセリンおよびスレオニンをリン酸化し、タウ蛋白質1分子あたり4残基以下のリン酸基を導入する。

(4)

5

(b) 基質特異性：脳抽出液の蛋白質の中で、微小管付随蛋白質であるタウ蛋白質およびMAP 2を特異的にリン酸化する。ヒストンをリン酸化しない。 α -カゼインを少しリン酸化する。

(c) 至適pH：チューブリン非存在下での至適pHは6.5であり、チューブリン存在下での至適pHは6.0である。

(d) 作用適温：37℃

【0008】(e) 分子量：0.5M塩化ナトリウムの存在下でのゲル濾過により求めた測定値は約5万であり、塩化ナトリウム非存在下ではタウ蛋白質と複合体を作り、そのゲル濾過による測定値は約10万である。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により求めた測定値は約4万5千である。

(f) 安定性：25%グリセロールと0.02%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート中、pH6.5、温度-20℃において少なくとも一年間安定である。

(g) 活性化：既知のキナーゼの活性化因子であるcAMP、cGMP、 Ca^{2+} 、カルモジュリンおよびリン脂質等では活性化されない。チューブリンの重合条件で、タウ蛋白質のリン酸化が活性化される。

(h) 阻害：90mMのNaClまたはKClで活性が半減する。

【0009】以下、本発明につき詳細に説明する。本発明で使用するリン酸化酵素I（以下、「タウプロテインキナーゼI」と略記する）は、例えばラットやウシ等の哺乳動物の脳抽出液から温度依存性の重合、脱重合等により微小管タンパク質画分を得、フォスフォセルロースカラムクロマトグラフィー、ゲル濾過、ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー、S-セファロースカラムクロマトグラフィー、ヘパリンカラムクロマトグラフィー等の操作を組み合わせることによって精製することができる（内田ら、生化学、第64巻、第5号、p. 308（1992））。精製されたタウプロテインキナーゼIは、上記(a)～(h)に記載の理化学的性質を有する。この精製蛋白の部分一次構造は、常法によりアミノ酸配列分析を行うことにより得ることができるが、全一次構造は同蛋白のcDNAをクローニングすることにより知ることができる。cDNAのクローニングには、上記の部分一次構造の情報に基づく方法、同蛋白に特異的な抗体を利用する方法、同蛋白に特異的な機能や作用の検出を利用する方法等が応用できる。また、部分アミノ酸配列に相当する合成ヌクレオチドオリゴマーをプライマーとして、ラット等の脳のmRNA画分から遺伝子増幅法（PCR法）を用いてかかるタウプロテインキナーゼIをコードするmRNAのみを増幅し、対応するcDNAをクローニングしてもよい。

【0010】かくして得られるウシ由来のタウプロテインキナーゼIの全一次構造は、例えば、配列表の配列番

6

号1に記載のアミノ酸配列で表される。なお、かかるウシ由来のタウプロテインキナーゼIの全一次構造は、GSK-3 β （グリコーゲンシンターゼ キナーゼ 3 β ）として知られる酵素（J. R. Woodgett, The EMBO J., 9（8）, 2431-2438（1990））と一致することが確認された。

【0011】タウプロテインキナーゼIは、上記のように哺乳動物の脳抽出液から精製することによって取得することもできるが、より大量かつ安定して取得するためには、クローニングにより得られたcDNAを適当なベクターに組み込み、そのベクターが作用しうる宿主にかかるベクターを導入すればタウプロテインキナーゼIの産生細胞を作成することができ、その培養物から目的とする蛋白を精製するのが好ましい。

【0012】本発明において基質となるタウ蛋白質は、哺乳動物の脳組織から、例えば井原らの方法（J. Biochem., 86, 587-590（1979））やGrundke-Iqbalらの方法（J. Biol. Chem., 261, 6084-6089（1986））に従って抽出、精製することができる。さらにその全一次構造は、上記タウプロテインキナーゼIと同様の手法により決定することができる。かくして得られるタウ蛋白質の全一次構造は、例えば配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で表されるもの等が挙げられる（Goedert et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4051-4055（1988））。

【0013】脳組織から抽出精製したタウ蛋白質は既にある程度リン酸化されており、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で144番目のセリンおよび／または315番目のセリンが部分的にリン酸化されている（後述の実施例1参照）。また、タウ蛋白質を下記の理化学的性質を有する別種のリン酸化酵素II（タウプロテインキナーゼII：内田ら、生化学、第64巻、第5号、p. 308（1992））で部分的にリン酸化すると、上記の配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で144番目のセリン、315番目のセリン以外にも、147番目のスレオニンおよび／または177番目のセリンがリン酸化される（内田ら、生化学、第64巻、第5号、p. 308（1992）；石黒ら、Neuroscience Letters, 128, 195（1991））。

【0014】(i) 作用：ATPをリン酸供与体として、タウ蛋白質中の、C末端側の隣にプロリンのあるセリンおよびスレオニンをリン酸化し、タウ蛋白質1分子あたり4残基のリン酸基を導入する。

(j) 基質特異性：脳抽出液の蛋白質の中で、微小管付随蛋白質であるタウ蛋白質およびMAP 2を特異的にリン酸化する。ヒストンH1とニューロフィラメントHサブユニットもリン酸化する。 β -カゼインを少しリン酸

(5)

7

化する。

(k) 至適 pH: チューブリン非存在下での至適 pH は 6.5 であり、チューブリン存在下での至適 pH は 6.0 である。

(l) 作用適温: 37℃

(m) 分子量: 0.5 M 塩化ナトリウムの存在下でのゲル濾過により求めた測定値は約 5 万であり、塩化ナトリウム非存在下ではタウ蛋白質と複合体を作り、そのゲル濾過による測定値は約 10 万である。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により求めた測定値は約 3 万であり、その他に 2.3 万の蛋白質があり、この 2 種の蛋白質が結合してゲル濾過では約 5 万になっている。

(n) 安定性: 25% グリセロールと 0.02% ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート中、pH 6.5、温度 -20℃ において少なくとも一年間安定である。

(o) 活性化: 既知のキナーゼの活性化因子である cAMP、cGMP、Ca²⁺、カルモジュリンおよびリン脂質等では活性化されない。チューブリンの重合条件で、タウ蛋白質のリン酸化が活性化される。

(p) 阻害: 40 mM の NaCl または KCl で活性が*

タウ蛋白質キナーゼ I I タウ蛋白質キナーゼ I

タウ蛋白質 ↓ タウ蛋白質 ↓ リン酸化タウ蛋白質
(脱リン酸化) → (正常にリン酸化) → (異常リン酸化)

本発明の基質としては、タウ蛋白質キナーゼ I の基質となりうるタウ蛋白質またはその部分ペプチドであればいずれのものも使用できる。例えば、

① 一次構造が配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列で表されるもの、

② スプライシングを受けた一次構造が配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列で表されるもの、

③ 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列の部分ペプチド

等が挙げられ、セリンおよび/またはスレオニンが部分的に、より好ましくは 1~4 残基リン酸化されているものが挙げられる。タウ蛋白質の具体例としては、Goedert et al の Neuron, 3, 519-526 (1989) に記載の 352 アミノ酸残基~441 アミノ酸残基の一次構造を有するタウ蛋白質等が挙げられる。一次構造が配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列で表されるタウ蛋白質を基質として使用した場合、同配列 141 番目のセリン、173 番目のスレオニン、307 番目のセリンおよび 324 番目のセリンから選ばれる 1 以上のアミノ酸がリン酸化される。従って本発明で好ましく用いられるタウ蛋白質の部分ペプチドとしては、配列表の配列番号 3~29 に記載のアミノ酸配列を含有してなるものが好ましい。以下に好ましい基質とそのリン酸化部位を示す。・配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド 4 番目のセリン、7 番目のスレオニン、37 番目のセリンおよび 1

8

* 半減する。

【0015】これは、タウ蛋白質キナーゼ I I が S/T-P (セリン/スレオニン-プロリン) 配列を認識する酵素であり、プロリンの N 末端側の隣位に位置するセリンおよび/またはスレオニンを特異的にリン酸化する性質によるものである。ところが、こうして部分的にリン酸化したタウ蛋白質は、前述の抗 ptau 抗体とは反応せず、tau-1 抗体との反応性のみを有していた。一方、上記のように脳組織から抽出、精製されたタウ蛋白質をアルカリフォスファターゼで処理することにより脱リン酸化してしまうと、本発明のリン酸化反応は認められるほどには進行せず、これに対し、脳組織から抽出、精製したタウ蛋白質またはタウ蛋白質キナーゼ I I を用いて部分的にリン酸化したタウ蛋白質を基質とすると、本発明のリン酸化反応が進行することが確認された(後述の実施例参照)。以上の事実から、タウ蛋白質のリン酸化反応は以下のような経路で進行しているものと考えられた。

【0016】

【化 1】

75 番目のセリンから選ばれる 1 以上のアミノ酸が予めリン酸化されており、1 番目のセリン、33 番目のスレオニン、167 番目のセリンおよび 184 番目のセリンから選ばれる 1 以上のアミノ酸がリン酸化される。

【0017】・配列表の配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

4 番目のセリン、7 番目のスレオニン、37 番目のセリンおよび 175 番目のセリンから選ばれる 1 以上のアミノ酸が予めリン酸化されており、1 番目のセリン、33 番目のスレオニンおよび 167 番目のセリンから選ばれる 1 以上のアミノ酸がリン酸化される。

【0018】・配列表の配列番号 5 に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

4 番目のセリン、7 番目のスレオニンおよび 37 番目のセリンから選ばれる 1 以上のアミノ酸が予めリン酸化されており、1 番目のセリン、33 番目のスレオニンおよび 167 番目のセリンから選ばれる 1 以上のアミノ酸がリン酸化される。

・配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

4 番目のセリン、7 番目のスレオニンおよび 37 番目のセリンから選ばれる 1 以上のアミノ酸が予めリン酸化されており、1 番目のセリンおよび/または 33 番目のスレオニンがリン酸化される。

【0019】・配列表の配列番号 7 に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

(6)

9

4 番目のセリンおよび／または 7 番目のスレオニンが予めリン酸化されており、1 番目のセリンおよび／または 3 3 番目のスレオニンがリン酸化される。・配列表の配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド 4 番目のセリンおよび／または 7 番目のスレオニンが予めリン酸化されており、1 番目のセリンがリン酸化される。

【0020】・配列表の配列番号9に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

4番目のセリンが予めリン酸化されており、1番目のセリンがリン酸化される。

・配列表の配列番号10に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

1 番目のセリン、4 番目のスレオニン、3 4 番目のセリンおよび1 7 2 番目のセリンから選ばれる1 以上のアミノ酸がγ-グルタミン酸化されており、3 0 番目のスレオニン、1 6 4 番目のセリンおよび1 8 1 番目のセリンから選ばれる1 以上のアミノ酸がリン酸化される。

【0021】・配列表の配列番号11に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

1 番目のセリン、4 番目のスレオニン、3 4 番目のセリンおよび1 7 2 番目のセリンから選ばれる1 以上のアミノ酸がγ-グルタミン酸化されており、3 0 番目のスレオニンおよび/または1 6 4 番目のセリンがγ-グルタミン酸化される。

・配列表の配列番号 12 に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

1 番目のセリン、4 番目のスレオニンおよび 3 4 番目のセリンから選ばれる 1 以上のアミノ酸が予めリン酸化されており、3 0 番目のスレオニンおよび／または 1 6 4 番目のセリンがリン酸化される。

【0022】・配列表の配列番号13に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

1 番目のセリン、4 番目のスレオニンおよび 3 4 番目のセリンから選ばれる 1 以上のアミノ酸がγ-リン酸化されており、30 番目のスレオニンがβ-リン酸化される。

・配列表の配列番号 14 に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

1 番目のセリンおよび／または 4 番目のスレオニンが予めリン酸化されており、30 番目のスレオニンがリン酸化される。

【0023】・配列表の配列番号15に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

1 番目のスレオニン、31 番目のセリンおよび 169 番目のセリンから選ばれる 1 以上のアミノ酸がリジン酸化されており、27 番目のスレオニン、161 番目のセリンおよび 178 番目のセリンから選ばれる 1 以上のアミノ酸がリジン酸化される。

【0024】・配列表の配列番号16に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

1 番目のスレオニン、3 1 番目のセリンおよび1 6 9 番

10

目のセリンから選ばれる 1 以上のアミノ酸がγ-グルタミン酸化されており、27 番目のスレオニンおよび/または 161 番目のセリンがリン酸化される。

・配列表の配列番号 17 に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

1 番目のスレオニンおよび／または 3 1 番目のセリンが
 予めリン酸化されており、2 7 番目のスレオニンおよび
 ／または 1 6 1 番目のセリンがリン酸化される。

【0025】・配列表の配列番号18に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

1 番目のスレオニンおよび／または 3 1 番目のセリンが、
 予めリン酸化されており、2 7 番目のスレオニンがリン
 酸化される。

・配列表の配列番号 19 に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

1 番目のスレオニンが予めリン酸化されており、27 番目のスレオニンがリン酸化される。

【0026】・配列表の配列番号20に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

20 5 番目のセリンおよび／または 1 4 3 番目のセリンが予
めリン酸化されており、1 番目のスレオニン、1 3 5 番
目のセリンおよび 1 5 2 番目のセリンから選ばれる 1 以
上のアミノ酸がリン酸化される。

・配列表の配列番号 21 に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

5 番目のセリンおよび／または 1 4 3 番目のセリンが予めリン酸化されており、1 番目のスレオニンおよび／または 1 3 5 番目のセリンがリン酸化される。

【0027】・配列表の配列番号22に記載のアミノ酸
30 配列を含有してなるペプチド
5番目のセリンが予めリン酸化されており、1番目のス
レオニンおよび／または135番目のセリンがリン酸化
される。

・配列表の配列番号 23 に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

5番目のセリンが予めリン酸化されており、1番目のスレオニンがリン酸化される。

【0028】・配列表の配列番号24に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

40 1 番目のセリンおよび／または 1 3 9 番目のセリンが予
めリン酸化されており、1 3 1 番目のセリンおよび／ま
たは 1 4 8 番目のセリンがリン酸化される。

・配列表の配列番号 25 に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

1 番目のセリンおよび／または 1 3 9 番目のセリンが予めリン酸化されており、1 3 1 番目のセリンがリン酸化される。

【0029】・配列表の配列番号26に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

1 番目のセリンが予めリン酸化されており、1 3 1 番目

(7)

11

のセリンがリン酸化される。

・配列表の配列番号27に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

9番目のセリンが予めリン酸化されており、1番目のセリンおよび／または18番目のセリンがリン酸化される。

【0030】・配列表の配列番号28に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

9番目のセリンが予めリン酸化されており、1番目のセリンがリン酸化される。

・配列表の配列番号29に記載のアミノ酸配列を含有してなるペプチド

*

100mM MES (pH2.7)	0.75M NaCl
0.5mM MgCl ₂	2mM DTT
1mM EGTA	0.1mM PMSF
0.1mM EDTA	

かかる液を95℃で5分間加熱し、次いで0℃で15分間冷却した後、10000Gで20分間遠心分離して上清を得る。この上清をアミコンPM-10膜等の限外濾過装置で濃縮し、蛋白質濃度を約7mg/mlにしてRBに透析する。この画分にはほぼ100%の純度でタウ蛋白質が含まれる。

【0032】またタウ蛋白質の部分ペプチドは、メリフィールドらの固相合成法(J. Am. Chem. Soc., 85, 2149-2154 (1964))により、Biosearch モデル9500等のペプチド合成機等を用いて合成することができる。タウ蛋白質を脱リン酸化する方法としては、例えばpH8.0の1M

トリス塩酸緩衝液中で、ウシ小腸アルカリフォスファターゼ(シグマ社 typeVII-NT)を添加して、37℃で5～8時間程度反応させ、タウ蛋白質をリン酸化することができる。アルカリフォスファターゼは、反応終了後に10分間程度の加熱処理して失活させればよい。

【0033】次に、本発明のリン酸化反応について説明する。本発明に使用する酵素(タウプロテインキナーゼI)は、至適pHが6.4、至適温度が37℃で、活性化剤として既知のセカンドメッセンジャーは要求せず、チューブリンによって活性化され、リン酸供与体としてヌクレオシド三リン酸を要求する。また、高濃度の塩化ナトリウムによって反応が阻害され、50%阻害に相当する塩化ナトリウム濃度は約100mMである。従って、本発明におけるリン酸化の反応条件は、上記の性質を考慮して定められた条件であれば特に制限はされず、より好ましくは100mMの2-(N-モルフォリン)エタンスルホン酸ナトリウム、0.9mM酢酸マグネシウム、0.4mMATPを含むpH6.4の緩衝液に適量の酵素と基質を添加して、37℃でインキュベートする。かかる緩衝液の種類、pH、温度等の条件は、任意に変更することが可能であり、例えばリン酸供与体とし

12

*1番目のセリンが予めリン酸化されており、10番目のセリンがリン酸化される。さらに本発明においては、前記のようにタウプロテインキナーゼIIでリン酸化された蛋白質またはそのペプチドもタウプロテインキナーゼIの基質として使用し得る。

【0031】具体的なタウ蛋白質の調製法としては、例えばJournal of Biological Chemistry, 261, 6084-6089 (1986)に記載の方法に従い、脳の微小管蛋白質に次の組成の液を3倍容添加する。

【表1】

てATPの代わりにグアノシン三リン酸を用いても構わない。即ち、pH3～10、温度0～70℃の範囲で、ヌクレオシド三リン酸の存在下において前述した基質の酵素を作用させることにより、本発明のリン酸化反応が進行する。

【0034】かかるリン酸化反応は、

(1) 蛋白質を基質とする場合

(a) リン酸化された量の定量

リン酸化反応時に[γ-³²P]ATPを0.5～5μCi/mlを加えて、リン酸化された蛋白質を³²Pで標識する。この反応液を2cm×2cmの正方形の濾紙に吸着させ、5%TCA-0.25%Na₂WO₄-0.5%ピロリン酸ナトリウム(pH2)に浸すことにより反応を停止し、この液で充分洗浄して残存する[γ-³²P]ATPを除去し、濾紙に残る放射能をシンチレーションカウンタで計測する。これによって蛋白質に取り込まれたリン酸基の量が定量できる。

【0035】(b) リン酸化部位の決定

反応液をLaemmliの系で電気泳動し(Nature, 227, 680-685 (1970))、ニトロセルロース膜に蛋白質を転写し、特定のリン酸化ペプチドに特異的に反応する抗体を用い、免疫ブロット法で染色の有無を調べる。(2) ペプチドを基質とする場合

(a) リン酸化された量の定量

リン酸化反応時に[γ-³²P]ATPを0.5～5μCi/mlを加えて、リン酸化されたペプチドを³²Pで標識する。この反応液にTCAを添加して高分子量の蛋白質を沈澱させた後、上清中のリン酸化ペプチドを円形の正方形のフォスフォセルロースペーパーに吸着させ、リン酸緩衝液で洗浄して残存する[γ-³²P]ATPを除去してから、濾紙に残った放射能をシンチレーションカウンタで計測する。これにより、ペプチドに取り込まれたリン酸基の量が定量できる。

【0036】(b) リン酸化部位の決定

(8)

13

反応液にPCAを添加して高分子量の蛋白質を沈澱させた後、上清液を逆相高速液体クロマトグラフィーにかける。その保持時間が予め調整した標準リン酸化ペプチドの保持時間と一致するか否かで、リン酸化部位の標準品との異同を判断することができる。またピーク画分を分離し、Neuroscience Letters, 128, 195-198 (1991) に石黒らが報告した方法に従って蛋白化学的分析を行うことにより、リン酸化部位を決定することができる。等の方法により、確認することができる。

【0037】具体的には、RB緩衝液（下記参照）中に、基質となるタウ蛋白質またはその部分ペプチドを200~600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、ATP 0.1~1mMおよびタウプロテインキナーゼを含有する組成物を、通常は37℃で1~16時間インキュベートし、TCA処理あるいは加熱処理によって反応を停止させる。その後上記の方法により、リン酸化反応を確認する。なお、リン酸化の量を定量する際には、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を0.5~5 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 添加して反応を行うことが好ましい。また、本発明に用いられる基質（タウ蛋白質）をタウプロテインキナーゼII等で予め部分的にリン酸化するには、石黒らのJ. Biochem., 104, 319 (1988) に記載の方法に準じて行うことができる。

【0038】なお、本発明の記載において、記号RB、RBG、MES、EGTA、EDTA、PMSF、PTH-アミノ酸、ATP、PC、SB、DTT、Tween 20、TCA、KLHはそれぞれ以下の略号である。RB: 100mM MES、0.5mM 酢酸マグネシウムおよび1mM EGTAからなる緩衝液 (pH 6.5)

RBG: RBに1mM GTPを添加した緩衝液
MES: 2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸
EGTA: エチレングリコールビス(β -アミノエチルエーテル)N, N, N', N'-テトラ酢酸
EDTA: エチレンジアミンテトラ酢酸
PMSF: フェニルメチルスルホニルフルオリド
PTH-アミノ酸: フェニルチオヒダントインアミノ酸
ATP: アデノシントリリン酸
PC: 20mM MES、0.5mM 酢酸マグネシウムおよび1mM EGTAからなる緩衝液 (pH 6.8)

SB: 20mM N-[2-ハイドロキシエチル]ピペラジン-N'-[2-エタンスルホン酸]、0.5mM 酢酸マグネシウムおよび1mM EGTAからなる緩衝液 (pH 8.2)

DTT: ジチオスレイトール

Tween 20: ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート

TCA: トリクロロ酢酸

KLH: キーホール・リンペットのヘモシアニン

14

【0039】

【実施例】以下、本発明につき参考例および実施例を挙げて説明するが、その要旨を越えない限り以下に限定されるものではない。

参考例1 タウプロテインキナーゼの調製

(1) 微小管蛋白質の調製

成牛15頭を断頭して直ちに脳を取り出し、血餅を素早く除去し、脳1gに1mlの0.5mM MgCl_2 、1mM EGTA-NaOH (pH 7)を加え、ゆっくり攪拌して液を捨て、血を洗い去った。

【0040】次いで、脳1gに1mlのRBを加えてワーリングブレンダー (18000rpm) で5秒間、3回ホモジナイズした後、30000Gで1時間遠心分離して、上清を採取した。この上清（脳抽出液）に1/3容のグリセロールとGTPを加えて溶液中のGTP濃度を合計で1mMとして、37℃に加温し30分間保持し、同温度において100000Gで30分間遠心分離して沈澱物を採取した。

【0041】この沈澱物を、前記脳抽出液の1/5容のRB中に懸濁させて0℃30分間保持した後、4℃において100000Gで30分間遠心分離し、得られた上清に、1/4容の50%グリセロールを含むRBを添加し、更に12.5mM フォスフォエノールビルビン酸、12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ビルビン酸キナーゼおよび250 μM GTPを1/25容加えて37℃で30分間加温した。次いで、この液を25%グリセロールを含むRB上に重層し、30℃において、100000Gで30分間スウィングローターで遠心分離して沈澱物を採取した。沈澱物を脳抽出液の1/25容のRBG中に懸濁させて0℃で30分間保持した後、100000Gで30分間遠心分離して微小管蛋白質を上清として得た。

【0042】以下の操作は、0.02% Tween 20、10%グリセロールの存在下で行った。

(2) 硫安分画

上記(1)で得た微小管蛋白質をRBで希釈して蛋白質濃度を10mg/mlとし、硫安の粉末を加えて35%飽和硫安液とし30分間放置した後、20000Gで20分間遠心分離して上清を採取した。この上清に再び硫安の粉末を加えて50%飽和硫安液として30分間放置した後、20000Gで20分間遠心分離して得られた沈澱物をRBに溶解し、RBに透析して硫安画分を得た。

(3) フォーフオセルロースカラムクロマトグラフィー
上記(2)で得た硫安画分に、50%グリセロールを含むRBを1/4容加えた。これを硫安画分の蛋白質30mg当たり1mlのP11セルロース（ワットマン社製）を含み、予めPCで平衡化した、P11セルロースのカラムにチャージし、カラムの5倍容の0.1M NaCl-PCでカラムを洗い、引き続いて0.1から0.8M NaCl-PCの直線濃度勾配の展開液をカラムに流し、0.2から0.4M NaClで溶出するPC画分

(9)

15

を採取した。

(4) ゲル濾過

上記(3)で得たPC画分を、アミコンPM-10膜の限外濾過装置で蛋白質濃度5mg/ml以上に濃縮し、これを予め0.3M NaCl-RB緩衝液で平衡化したG3000SWカラム(東ソー社製;シリカゲルカラム、2.1mm×60cm)にチャージし、2ml/分の流速で流通させてゲル濾過を行った。タウプロテインキナーゼ画分(分子量5万の画分)を採取し、アミコンPM-10膜の限外濾過装置で濃縮した。

(5) ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー

上記(4)で得た画分を、予め12mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.8)で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム(東燃社製;7.5mm×100mm)にチャージし、12から400mMのリン酸ナトリウム緩衝液の直線濃度勾配10mlで展開し、150mMの濃度で溶出するHA画分を採取した。

(6) S-セファロースカラムクロマトグラフィー

上記(5)の画分をPCで透析し、予めPCで平衡化したS-セファロースカラム(ファルマシア社製;5mm×20mm)にチャージし、PCとSBの直線勾配7.5ml、続いてSB中で0から200mM NaClの直線濃度勾配5mlで展開し、150mMの濃度で溶出するS1画分および50mMの濃度で溶出するS2画分を採取した。S2画分はRBで透析して、タウプロテインキナーゼI画分とした。

(7) ヘパリンカラムクロマトグラフィー

上記S1の画分を20mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.6)で平衡化したTSKゲルAF-ヘパリンカラム(東ソー社製;4mm×8mm)にチャージし、20mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.6)中で、0から200mM NaClの直線濃度勾配4mlで展開し、80mM NaClで溶出するヘパリン画分を採取した。この画分をRBに透析して、タウプロテインキナーゼI画分とした。

【0043】かくして得られたタウプロテインキナーゼIは、以下の理化学的性質を有するものであった。

(a) 作用: ATPをリン酸供与体として、タウ蛋白質中のセリンおよびスレオニンをリン酸化し、タウ蛋白質1分子あたり4残基のリン酸基を導入する。

(b) 基質特異性: 脳抽出液の蛋白質の中で、微小管付随蛋白質であるタウ蛋白質およびMAP2を特異的にリン酸化する。ヒストンをリン酸化しない。 α -カゼインを少しリン酸化する。

【0044】(c) 至適pH: チューブリン非存在下での至適pHは6.5であり、チューブリン存在下での至適pHは6.0である。

(d) 作用適温: 37℃

(e) 分子量: 0.5M塩化ナトリウム存在下でのゲ

16

ル濾過により求めた測定値は約5万であり、塩化ナトリウム非存在下ではタウ蛋白質と複合体を作り、そのゲル濾過による測定値は約10万である。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により求めた測定値は約4万5千である。

【0045】(f) 安定性: 25%グリセロールと0.02%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート中、pH6.5、温度-20℃において少なくとも一年間安定である。

(g) 活性化: 既知のキナーゼの活性化因子であるcAMP、cGMP、 Ca^{2+} 、カルモジュリンおよびリン脂質等では活性化されない。チューブリンの重合条件で、タウ蛋白質のリン酸化が活性化される。

【0046】(h) 阻害: 90mMのNaClまたはKClで活性が半減する。また、タウプロテインキナーゼIIは、以下の理化学的性質を有するものであった。

(i) 作用: ATPをリン酸供与体として、タウ蛋白質中の、C末端側の隣にプロリンのあるセリンおよびスレオニンをリン酸化し、タウ蛋白質1分子あたり4残基のリン酸基を導入する。

【0047】(j) 基質特異性: 脳抽出液の蛋白質の中で、微小管付随蛋白質であるタウ蛋白質およびMAP2を特異的にリン酸化する。ヒストンH1とニューロフィラメントHサブユニットもリン酸化する。 β -カゼインを少しリン酸化する。

(k) 至適pH: チューブリン非存在下での至適pHは6.5であり、チューブリン存在下での至適pHは6.0である。

【0048】(l) 作用適温: 37℃

(m) 分子量: 0.5M塩化ナトリウム存在下でのゲル濾過により求めた測定値は約5万であり、塩化ナトリウム非存在下ではタウ蛋白質と複合体を作り、そのゲル濾過による測定値は約10万である。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により求めた測定値は約3万であり、その他に2.3万の蛋白質があり、この2種の蛋白質が結合してゲル濾過では約5万になっている。

【0049】(n) 安定性: 25%グリセロールと0.02%ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート中、pH6.5、温度-20℃において少なくとも一年間安定である。

(o) 活性化: 既知のキナーゼの活性化因子であるcAMP、cGMP、 Ca^{2+} 、カルモジュリンおよびリン脂質等では活性化されない。チューブリンの重合条件で、タウ蛋白質のリン酸化が活性化される。

【0050】(p) 阻害: 40mMのNaClまたはKClで活性が半減する。

参考例2 タウプロテインキナーゼIのクローニング
ウシ15頭から精製したタウプロテインキナーゼI 約60pmolesをエンドプロテアーゼ Lys-C (Boehringer Mannheim Gmb

H)で消化し、C₈のカラム(RP-300, Applied Biosystems Inc.)を用いて逆相高速液体クロマトグラフィーを行った。0.1%トリフルオロ酢酸中、アセトニトリル0%から70%の濃度勾配溶出で以下の8個のペプチドを分取し、一部は再度クロマトグラフィーにより精製して、シーケンサー(Applied Biosystems Inc., 477A)を用いてアミノ酸配列を決定した。

【0051】2K06:配列表の配列番号30

2K13:配列表の配列番号31

2K19:配列表の配列番号32

2K20:配列表の配列番号33

2K33:配列表の配列番号34

2K35:配列表の配列番号35

2K37:配列表の配列番号36

上記8個のペプチドのうち、2K35および2K37のアミノ酸配列をもとに、配列表の配列番号37に記載のセンスプライマーおよび配列番号38に記載のアンチセンスプライマーを合成し、ウシの脳組織から調製したcDNAをテンプレートとして、Saikiらの開発したポリメラーゼチェーンリアクション法(PCR法: Nature, 324, 126 (1986))に準じて遺伝子増幅を行った。その結果、配列表の配列番号39に示す主要産物を得た。同産物において、二つのプライマーにはさまれた15ヌクレオチドは、上記のペプチドから期待される配列であった。

【0052】更に配列表の配列番号39に示す配列をもとに、新たに41ヌクレオチドのアンチセンスプライマー(配列表の配列番号40)を合成し、5'末端を³²Pで標識してcDNAクローンをスクリーニングするためのプローブとした。cDNAライブラリーは市販のもの(Clontech社)を利用した。これはラット大脳皮質のmRNAをランダムプライミング法で合成したcDNAをλgt11に挿入したものである。常法に従い、48℃でハイブリダイズし×1SSC(0.3M

塩化ナトリウム および 0.03M クエン酸ナトリウムからなる緩衝液)、35℃で洗浄することにより、約60万のクローンから1個の陽性クローン(#31)を得た。#31は約1.3kbのインサートを持ち、それをpUC19にサブクローニングしてDNA配列を求めた。この配列の同一フレーム上に上記8個のペプチド全てのアミノ酸配列が確認されたが、3'末端側には終止コドンは存在しなかった。そこでこの配列の一部をプローブとして用い、新たなクローン(#11)を得た。#11のインサートは、クローン#31の配列の途中から始まり、約1.2kbの大きさであった。両者の配列を連結し、約420アミノ酸残基のオープンリーディングフレーム(ORF)の存在を確認した。かかるアミノ酸配列および塩基配列を配列表の配列番号1に、制限酵素地図を図1に示す。

実施例1

Goedertらの方法(Neuron, 3, 519-526 (1989))に準じてヒトの脳から抽出精製した、一次構造が配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で表されるタウ蛋白質をタウプロテインキナーゼIIでリン酸化した後、1M尿素、20mMメチルアミンおよび50mMリン酸ナトリウムを含むpH8.5の緩衝液中で、タウ蛋白質の1/20(重量比)のエンドプロテアーゼLys-C(Boehringer Mannheim GmbH)を添加して、37℃で2時間酵素消化した。生成したペプチドは、逆相高速カラムクロマトグラフィーで分離した。このときカラムはC₄カラム(Bakerbond, 4.6mm×5cm)を使用し、溶出液としては0.1%トリフルオロ酢酸中、アセトニトリルとイソプロパノールの混合溶媒(混合比3:7)を全溶媒の0%から70%まで直線勾配で増加させた。

【0053】次にタウ蛋白質を(γ-³²P)ATP共存下でリン酸化した。³²Pで標識されたペプチドのピークは3つ検出され、溶出順にpK1、pK2およびpK3と名付けた(「p」はリン酸化されたことを示す)。非放射性のATPを用いても同様にタウ蛋白質をリン酸化した。分取されたpK1、pK2およびpK3のそれぞれの画分は、気相プロテインシーケンサー(Applied Biosystems 477A)を用いてペプチドのアミノ酸配列を分析した。その結果、K1は配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で168番目のバリンから182番目のリジンに至るペプチド、K2は133番目のセリンから166番目のリジンに至るペプチド、K3は307番目のセリンから349番目のリジンに至るペプチドであり、pK1、pK2およびpK3のそれぞれについてリン酸化部位も以下のように決定された。すなわち、アミノ酸配列分析においてリン酸化セリンはDTT存在下でPTH-デヒドロアラニンを経由してDTT付加物を生成し、PTH-セリンを生じないことが知られている(Meyerら, FEBS Lett., 204, 61-66 (1986))。同様にリン酸化スレオニンでもDTT付加物を生ずるが、PTH-スレオニンを生成しない。これによってpK1では配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列における177番目のセリンが、pK2では144番目のセリンと147番目のスレオニンが、pK3では315番目のセリンがリン酸化されていることが判明した。

【0054】この結果に基づいて、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で140番目のセリンから151番目のアルギニンに至るペプチドにおいて144番目のセリンのみ、147番目のスレオニンのみ、および144番目のセリンと147番目のスレオニンの両者にリン酸基を導入した3つのペプチド(それぞれ配列表の配列番号41、42および43)と、306番目のリジンから317番目のアルギニンに至るペプチドにおいて31

(11)

19

5番目のセリンにリン酸基を導入したペプチド（配列表の配列番号44）を合成し、それぞれをKLHに結合した後ウサギに免疫し、得られた抗血清を精製して特異性を調べることによって、144番目のセリンを特異的に認識する抗PS144抗体、147番目のスレオニンを特異的に認識する抗PT147抗体および315番目のセリンを特異的に認識する抗PS315抗体を取得した。

【0055】一方、タウ蛋白質を脱リン酸化処理したもの、それをさらにタウプロテインキナーゼIIでリン酸化したものを未処理のものと、電気泳動およびイムノブロッティング（Toubinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350-4354 (1979)）で比較した。その結果、電気泳動では脱リン酸化タウ蛋白質、未処理のタウ蛋白質、タウプロテインキナーゼIIでリン酸化したタウ蛋白質の順に移動度が小さかった。また抗PS144抗体、抗PT147抗体および抗PS315抗体との反応性については、脱リン酸化したタウ蛋白質はいずれの抗体とも反応せず、タウプロテインキナーゼIIでリン酸化したタウ蛋白質はいずれの抗体とも反応し、未処理のタウ蛋白質は抗PS144抗体および抗PS315抗体と比較的弱いながらも十分に認められる反応を示した。

【0056】これらの各種タウ蛋白質を基質としてタウプロテインキナーゼIによるリン酸化を以下のように試みた。まず未処理のタウ蛋白質、脱リン酸化処理したタウ蛋白質および脱リン酸化後にタウプロテインキナーゼIIでリン酸化したタウ蛋白質に $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP存在下および非存在下でタウプロテインキナーゼIを作用させたところ、脱リン酸化処理したタウ蛋白質の場合は電気泳動の移動度に変化はなく、 ^{32}P の取り込みも極めてわずかであったが、他の2つのタウ蛋白質の場合は電気泳動の移動度が小さくなり、 ^{32}P が多量に取り込まれてリン酸化が進行したことが明らかであった。次にタウプロテインキナーゼIとIIの作用を比較するため、それぞれのキナーゼで未処理のタウ蛋白質をリン酸化した後に、抗体との反応性をイムノブロッティング法で調べた。ここで使用したtau-1抗体は脳内に存在する正常なタウ蛋白質との反応は強く、PHF中の異常にリン酸化されたタウ蛋白質との反応は弱いとされている抗体であり、一方抗p-tau抗体はPHF中の異常リン酸化タウ蛋白質に特異的に反応する抗体である。イムノブロッティングの結果、tau-1抗体との反応性はリン酸化していないタウ蛋白質で最も強く、タウプロテインキナーゼIまたはIIでリン酸化すると反応が弱くなり、特にタウプロテインキナーゼIでリン酸化して電気泳動の移動度が最も小さくなったバンドは、tau-1抗体と反応しなかった。これに対し抗p-tau抗体との反応性はタウプロテインキナーゼIによるリン酸化によって初めて観察された。

20

【0057】以上の結果から、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において144番目のセリン、147番目のスレオニン、177番目のセリンおよび315番目のセリンから選ばれる1以上のアミノ酸がリン酸化されたタウ蛋白質を基質としてタウプロテインキナーゼIを作用させると、PHF中の異常リン酸化と同様なリン酸化が進行することがわかった。

実施例2

一次構造が配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で表されるタウ蛋白質をタウプロテインキナーゼIIでリン酸化した後、さらに $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP存在下でタウプロテインキナーゼIでリン酸化してから、エンドプロテアーゼ Lys-Cで酵素消化した。実施例1と同様にして ^{32}P を取り込んだペプチド・ピークを同定し、さらに実施例1と同様にして相当する非標識ペプチドを分離した。これらのペプチドはアミノ酸配列分析により、実施例1のpK1、pK2およびpK3に相当することが確認され、これらがタウプロテインキナーゼIによってさらにリン酸化されたものであると結論した。これらのペプチドを、それぞれppK1、ppK2およびppK3と呼ぶ。それぞれのアミノ酸配列分析において、実施例1と同様にPTH-アミノ酸がセリンまたはスレオニンの脱水物のPTH誘導体のDTT付加物であるかどうかでリン酸化部位を判定したところ、ppK1においては配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列における173番目のスレオニン、ppK2では141番目のセリン、ppK3では307番目のセリンと324番目のセリンがタウプロテインキナーゼIによってリン酸化されたアミノ酸であることが判明した。

実施例3

配列表の配列番号45に記載のアミノ酸配列で表されるペプチドを合成し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP存在下でタウプロテインキナーゼIでリン酸化したが、該ペプチドには ^{32}P は取り込まれなかった。しかし、このペプチドをタウプロテインキナーゼIIで予めリン酸化することにより、その一部をタウプロテインキナーゼIでリン酸化することができた。タウプロテインキナーゼIによるリン酸化の前後のペプチドのアミノ酸配列分析を比較したところ、配列表の配列番号45に記載のアミノ酸配列において6番目のスレオニンに相当するPTH-アミノ酸がリン酸化前ではPTH-スレオニンであったのに対し、リン酸化後ではPTH-デヒドロ- α -アミノ酪酸のDTT付加物であった。なお、同配列において10番目のセリンに相当するPTH-アミノ酸は、いずれもPTH-デヒドロアラニンのDTT付加物であった。

【0058】この結果から、配列表の配列番号45に記載のアミノ酸配列で表されるペプチドのタウプロテインキナーゼIによるリン酸化には、タウプロテインキナーゼIIによる10番目のセリンのリン酸化が必要であり、かつタウプロテインキナーゼIによるリン酸化の部

(12)

21

位は6番目のスレオニンであることがわかった。

実施例4

配列表の配列番号46に記載のアミノ酸配列で表されるペプチドを合成し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP存在下でタウプロテインキナーゼIでリン酸化したが、該ペプチドには ^{32}P は取り込まれなかった。しかし、このペプチドをタウプロテインキナーゼIIで予めリン酸化することにより、その一部をタウプロテインキナーゼIでリン酸化することができた。タウプロテインキナーゼIによるリン酸化の前後のペプチドのアミノ酸配列分析を比較したところ、配列表の配列番号46に記載のアミノ酸配列において9番目のセリンに相当するPTH-アミノ酸がリン酸化前ではPTH-セリンであったのに対し、リン酸化後ではPTH-デヒドロアラニンのDTT付加物であった。なお、同配列において12番目のセリンに相当するPTH-アミノ酸は、いずれもPTH-デヒドロアラニンのDTT付加物であり、15番目のスレオニンに相当するPTH-アミノ酸は、いずれもPTH-デヒドロ α -アミノ酪酸のDTT付加物であった。

【0059】この結果から、配列表の配列番号46に記載のアミノ酸配列で表されるペプチドのタウプロテインキナーゼIによるリン酸化には、タウプロテインキナーゼIIによるリン酸化が必要であり、かつタウプロテインキナーゼIによるリン酸化の部位は9番目のセリンで*

配列

```

GGCCAAGAGA ACGAAGTCTT TTTTTTTTTT TTCTTGCGGG AGAACTTAAT GCTGCATTTA 60
TTATTAACCT AGTACCCTAA CATAAAACAA AAGGAAGAAA AGGATTAAGG AAGGAAAAGG 120
TGAATCGAGA AGAGCCATC ATG TCG GGG CGA CCG AGA ACC ACC TCC TTT GCG 172
Met Ser Gly Arg Pro Arg Thr Thr Ser Phe Ala
      1             5             10
GAG AGC TGC AAG CCA GTG CAG CAG CCT TCA GCT TTT GGT AGC ATG AAA 220
Glu Ser Cys Lys Pro Val Gln Gln Pro Ser Ala Phe Gly Ser Met Lys
      15             20             25
GTT AGC AGA GAT AAA GAT GGC AGC AAG GTA ACC ACA GTG GTG GCA ACT 268
Val Ser Arg Asp Lys Asp Gly Ser Lys Val Thr Thr Val Val Ala Thr
      30             35             40
CCT GGA CAG GGT CCT GAC AGG CCA CAG GAA GTC AGT TAC ACA GAC ACT 316
Pro Gly Gln Gly Pro Asp Arg Pro Gln Glu Val Ser Tyr Thr Asp Thr
      45             50             55
AAA GTC ATT GGA AAT GGG TCA TTT GGT GTG GTA TAT CAA GCC AAA CTT 364
Lys Val Ile Gly Asn Gly Ser Phe Gly Val Val Tyr Gln Ala Lys Leu
      60             65             70             75
TGT GAC TCA GGA GAA CTG GTG GCC ATC AAG AAA GTT CTT CAG GAC AAG 412
Cys Asp Ser Gly Glu Leu Val Ala Ile Lys Lys Val Leu Gln Asp Lys
      80             85             90
CGA TTT AAG AAC CGA GAG CTC CAG ATC ATG AGA AAG CTA GAT CAC TGT 460
Arg Phe Lys Asn Arg Glu Leu Gln Ile Met Arg Lys Leu Asp His Cys
      95             100            105
AAC ATA GTC CGA TTG CGG TAT TTC TTC TAC TCG AGT GGC GAG AAG AAA 508
Asn Ile Val Arg Leu Arg Tyr Phe Phe Tyr Ser Ser Gly Glu Lys Lys

```

22

* あることがわかった。

実施例5

配列表の配列番号47に記載のアミノ酸配列で表されるペプチドを合成し、次いでそれをタウプロテインキナーゼIIでリン酸化したペプチドを合成した。それぞれのペプチドについて $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP存在下でタウプロテインキナーゼIでリン酸化を試みたところ、 ^{32}P の取り込みはリン酸化ペプチドの場合にのみ認められた。

【0060】

【発明の効果】本発明のリン酸化方法は、タウ蛋白質に対し特異的に作用するものであり、アルツハイマー病およびアルツハイマー型老年痴呆の病因の解明、さらにはこれを予防または治療する薬物の探索への応用が期待される。

【0061】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：1932

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to genomic RNA

起源

生物名：ラット

(13)

23		24
110	115	120
GAT GAG GTC TAC CTT AAC CTG GTG CTG GAC TAT GTT CCG GAA ACA GTG		556
Asp Glu Val Tyr Leu Asn Leu Val Leu Asp Tyr Val Pro Glu Thr Val		
125	130	135
TAC AGA GTC GCC AGA CAC TAT AGT CGA GCC AAG CAG ACA CTC CCT GTG		604
Tyr Arg Val Ala Arg His Tyr Ser Arg Ala Lys Gln Thr Leu Pro Val		
140	145	150
ATC TAT GTC AAG TTG TAT ATG TAC CAG CTG TTC AGA AGT CTA GCC TAT		652
Ile Tyr Val Lys Leu Tyr Met Tyr Gln Leu Phe Arg Ser Leu Ala Tyr		
160	165	170
ATC CAT TCC TTT GGG ATC TGC CAT CGA GAC ATT AAA CCA CAG AAC CTC		700
Ile His Ser Phe Gly Ile Cys His Arg Asp Ile Lys Pro Gln Asn Leu		
175	180	185
TTG CTG GAT CCT GAT ACA GCT GTA TTA AAA CTC TGC GAC TTT GGA AGT		748
Leu Leu Asp Pro Asp Thr Ala Val Leu Lys Leu Cys Asp Phe Gly Ser		
190	195	200
GCA AAG CAG CTG GTC CGA GGA GAG CCC AAT GTT TCA TAT ATC TGT TCT		796
Ala Lys Gln Leu Val Arg Gly Glu Pro Asn Val Ser Tyr Ile Cys Ser		
205	210	215
CGG TAC TAC AGG GCA CCA GAG CTG ATC TTT GGA GCC ACC GAT TAC ACG		844
Arg Tyr Tyr Arg Ala Pro Glu Leu Ile Phe Gly Ala Thr Asp Tyr Thr		
220	225	230
TCT AGT ATA GAT GTA TGG TCT GCA GGC TGT GTG TTG GCT GAA TTG TTG		892
Ser Ser Ile Asp Val Trp Ser Ala Gly Cys Val Leu Ala Glu Leu Leu		
240	245	250
CTA GGA CAA CCA ATA TTT CCT GGG GAC AGT GGT GTG GAT CAG TTG GTG		940
Leu Gly Gln Pro Ile Phe Pro Gly Asp Ser Gly Val Asp Gln Leu Val		
255	260	265
GAA ATA ATA AAG GTC CTA GGA ACA CCA ACA AGG GAG CAA ATT AGA GAA		988
Glu Ile Ile Lys Val Leu Gly Thr Pro Thr Arg Glu Gln Ile Arg Glu		
270	275	280
ATG AAC CCA AAT TAT ACA GAA TTC AAA TTC CCC CAA ATC AAG GCA CAT		1036
Met Asn Pro Asn Tyr Thr Glu Phe Lys Phe Pro Gln Ile Lys Ala His		
285	290	295
CCT TGG ACG AAG GTC TTT CGG CCC CGA ACT CCA CCA GAG GCA ATC GCA		1084
Pro Trp Thr Lys Val Phe Arg Pro Arg Thr Pro Pro Glu Ala Ile Ala		
300	305	310
CTG TGT AGC CGT CTC CTG GAG TAC ACG CCG ACC GCC CGG CTA ACA CCA		1132
Leu Cys Ser Arg Leu Leu Glu Tyr Thr Pro Thr Ala Arg Leu Thr Pro		
320	325	330
CTG GAA GCT TGT GCA CAT TCA TTT TTT GAT GAA TTA CGG GAC CCA AAT		1180
Leu Glu Ala Cys Ala His Ser Phe Phe Asp Glu Leu Arg Asp Pro Asn		
335	340	345
GTC AAA CTA CCA AAT GGG CGA GAC ACA CCT GCC CTC TTC AAC TTT ACC		1228
Val Lys Leu Pro Asn Gly Arg Asp Thr Pro Ala Leu Phe Asn Phe Thr		
350	355	360
ACT CAA GAA CTG TCA AGT AAC CCA CCT CTG GCC ACC ATC CTT ATC CCT		1276
Thr Gln Glu Leu Ser Ser Asn Pro Pro Leu Ala Thr Ile Leu Ile Pro		
365	370	375
CCT CAC GCT CGG ATT CAG GCA GCT GCT TCA CCG CCT GCA AAC GCC ACA		1324

(14)

25 26
 Pro His Ala Arg Ile Gln Ala Ala Ala Ser Pro Pro Ala Asn Ala Thr
 380 385 390 395
 GCA GCC TCA GAT ACT AAT GCT GGA GAC CGT GGA CAG ACC AAT AAC GCC 1372
 Ala Ala Ser Asp Thr Asn Ala Gly Asp Arg Gly Gln Thr Asn Asn Ala
 400 405 410
 GCT TCT GCA TCA GCC TCC AAC TCT ACC TGA ACAG CCCCAAGTAG CCAGCTGCCG1426
 Ala Ser Ala Ser Ala Ser Asn Ser Thr Stop
 415 420
 AGGGAAGACC AGCACTTACT TGAGTGCCAC TCAGCAACAC TGGTCACGTT TGGAAAGAAA 1486
 ATTAAGAAAGA GGAAACAAA AACAAAAACA AAAAACCCCG GCTTTGGTTT GTTCTTCTT 1546
 TCTTCTTTTC CTCTATTTTC TTTTAAAA ATCTGTTTCT CCTTTAAAA AAATTAAGAT 1606
 GAAGTCAAGT CTGATGTCAT GGGTAACCCC ACCTACTTGG AAGGCTGAGT CTAGAGGTTT 1666
 ACAGCTCAAG CCCATGCTGG ACTACAGTGG GAGTCCAAGG CCAGCNTGGG CAACTTAAAA 1726
 AGAAGTTGTT TCAAAAACGA CAAAGTTGGC TGATAATATG GCTCTCCAAG AGCCACAATA 1786
 AATAAATATG TAAATAAACT CAAATAAGTC TTGTAATTTA AATTACACTA AACTAGGTTA 1846
 ACTTTTAAAC TCTCATCTTT AAGAACTACA GGTTTAAAAA CCCAACGGTT GTTTTATGTA 1906
 TTAGGGAAAA ATGAAAAATC TAATATAAAA AGAAGCAGCA ACAGCAGCAG GAGCCAACCA 1966
 AAGGAT 1972

N : 未同定

【0062】配列番号：2

配列の長さ：352

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

20 * 配列の種類：タンパク質

起源

生物名：ヒト

*

配列

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Ala Glu Glu Ala
 35 40 45
 Gly Ile Gly Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val
 50 55 60
 Thr Gln Ala Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp
 65 70 75 80
 Asp Lys Lys Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro
 85 90 95
 Arg Gly Ala Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg
 100 105 110
 Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly
 115 120 125
 Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
 130 135 140
 Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
 145 150 155 160
 Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
 165 170 175
 Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
 180 185 190
 Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asp Leu
 195 200 205

(15)

27 28
 Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val
 210 215 220
 Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His
 225 230 235 240
 His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp
 245 250 255
 Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr
 260 265 270
 His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr
 275 280 285
 Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val
 290 295 300
 Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser
 305 310 315 320
 Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu
 325 330 335
 Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 340 345 350

【0063】配列番号：3

配列の長さ：184

配列の型：アミノ酸

* トポロジー：直鎖状

20 配列の種類：ペプチド

*

配列

Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser
 1 5 10 15
 Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg
 20 25 30
 Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala
 35 40 45
 Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser
 50 55 60
 Thr Glu Asp Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val
 65 70 75 80
 Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
 85 90 95
 Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
 100 105 110
 Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu
 115 120 125
 Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
 130 135 140
 His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly
 145 150 155 160
 Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro
 165 170 175
 Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser
 180

【0064】配列番号：4

配列の長さ：176

配列の型：アミノ酸

※ トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※

配列

50

(16)

29 30
 Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser
 1 5 10 15
 Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg
 20 25 30
 Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala
 35 40 45
 Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser
 50 55 60
 Thr Glu Asp Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val
 65 70 75 80
 Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
 85 90 95
 Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
 100 105 110
 Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu
 115 120 125
 Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
 130 135 140
 His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly
 145 150 155 160
 Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro
 165 170 175

【0065】配列番号：5

配列の長さ：167

配列の型：アミノ酸

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

*

配列

Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser
 1 5 10 15
 Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg
 20 25 30
 Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala
 35 40 45
 Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser
 50 55 60
 Thr Glu Asp Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val
 65 70 75 80
 Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
 85 90 95
 Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
 100 105 110
 Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu
 115 120 125
 Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
 130 135 140
 His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly
 145 150 155 160
 Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser
 165

【0066】配列番号：6

配列の長さ：38

配列の型：アミノ酸

50 トポロジー：直鎖状

(17)

31

32

配列の種類：ペプチド

配列

Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser
 1 5 10 15
 Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg
 20 25 30
 Thr Pro Pro Lys Ser Pro
 35

【0067】配列番号：7

配列の長さ：33

配列の型：アミノ酸

* トポロジー：直鎖状

10 配列の種類：ペプチド

*

配列

Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser
 1 5 10 15
 Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg
 20 25 30

Thr

【0068】配列番号：8

配列の長さ：8

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※配列の種類：ペプチド

配列

20

Ser Pro Gly Ser Pro

1

5

配列

Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro
 1 5

【0069】配列番号：9

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

【0070】配列番号：10

配列の長さ：181

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※

30

配列

Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr
 1 5 10 15
 Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro
 20 25 30
 Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro
 35 40 45
 Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asp
 50 55 60
 Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
 65 70 75 80
 Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
 85 90 95
 His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
 100 105 110
 Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
 115 120 125
 Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu
 130 135 140
 Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile
 145 150 155 160

(18)

³³
 Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu
 165 170 175
 Ser Asn Val Ser Ser
 180

【0071】配列番号：11

配列の長さ：173

配列の型：アミノ酸

*トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

*

配列

Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr
 1 5 10 15
 Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro
 20 25 30
 Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro
 35 40 45
 Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asp
 50 55 60
 Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
 65 70 75 80
 Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
 85 90 95
 His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
 100 105 110
 Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
 115 120 125
 Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu
 130 135 140
 Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile
 145 150 155 160
 Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro
 165 170

【0072】配列番号：12

配列の長さ：164

配列の型：アミノ酸

※トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※

配列

Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr
 1 5 10 15
 Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro
 20 25 30
 Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro
 35 40 45
 Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asp
 50 55 60
 Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro
 65 70 75 80
 Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile
 85 90 95
 His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu
 100 105 110
 Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile
 115 120 125

(19)

³⁵ Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu ³⁶
 130 135 140
 Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile
 145 150 155 160
 Val Tyr Lys Ser

【0073】配列番号：13

配列の長さ：35

配列の型：アミノ酸

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

*

配列

Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr
 1 5 10 15
 Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro
 20 25 30
 Lys Ser Pro
 35

【0074】配列番号：14

配列の長さ：30

配列の型：アミノ酸

※ トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※

配列

Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr
 1 5 10 15
 Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr
 20 25 30

【0075】配列番号：15

配列の長さ：178

配列の型：アミノ酸

★ トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

★

配列

Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr
 1 5 10 15
 Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro
 20 25 30
 Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp
 35 40 45
 Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asp Leu Lys His
 50 55 60
 Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu
 65 70 75 80
 Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys
 85 90 95
 Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys
 100 105 110
 Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val
 115 120 125
 Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg
 130 135 140
 Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys
 145 150 155 160
 Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val
 165 170 175
 Ser Ser

(20)

37

【0076】配列番号：16

配列の長さ：170

配列の型：アミノ酸

配列

```

Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr
 1           5           10           15
Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro
          20           25           30
Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp
          35           40           45
Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asp Leu Lys His
          50           55           60
Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu
          65           70           75           80
Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys
          85           90           95
Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys
          100          105          110
Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val
          115          120          125
Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg
          130          135          140
Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys
          145          150          155          160
Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro
          165          170

```

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

*

38

【0077】配列番号：17

配列の長さ：161

配列の型：アミノ酸

配列

```

Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr
 1           5           10           15
Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro
          20           25           30
Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp
          35           40           45
Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asp Leu Lys His
          50           55           60
Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu
          65           70           75           80
Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys
          85           90           95
Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys
          100          105          110
Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val
          115          120          125
Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg
          130          135          140
Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys
          145          150          155          160

```

※ トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※

30

(21)

39

40

Ser

【0078】配列番号：18

配列の長さ：32

配列の型：アミノ酸

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

*

配列

Thr	Pro	Gly	Ser	Arg	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr
1				5				10					15		
Arg	Glu	Pro	Lys	Lys	Val	Ala	Val	Val	Arg	Thr	Pro	Pro	Lys	Ser	Pro
			20					25					30		

【0079】配列番号：19

配列の長さ：27

配列の型：アミノ酸

10※ トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※

配列

Thr	Pro	Gly	Ser	Arg	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr
1				5				10					15		
Arg	Glu	Pro	Lys	Lys	Val	Ala	Val	Val	Arg	Thr					
			20					25							

【0080】配列番号：20

配列の長さ：152

配列の型：アミノ酸

★ トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

★ 20

配列

Thr	Pro	Pro	Lys	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Lys	Ser	Arg	Leu	Gln	Thr	Ala
1			5					10					15		
Pro	Val	Pro	Met	Pro	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Lys	Ser	Lys	Ile	Gly	Ser
			20					25					30		
Thr	Glu	Asp	Leu	Lys	His	Gln	Pro	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Gln	Ile	Val
		35				40						45			
Tyr	Lys	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	Lys	Val	Thr	Ser	Lys	Cys	Gly	Ser	Leu
		50				55						60			
Gly	Asn	Ile	His	His	Lys	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Glu	Val	Lys	Ser
		65			70					75				80	
Glu	Lys	Leu	Asp	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Gln	Ser	Lys	Ile	Gly	Ser	Leu
			85					90						95	
Asp	Asn	Ile	Thr	His	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Asn	Lys	Lys	Ile	Glu	Thr
		100						105					110		
His	Lys	Leu	Thr	Phe	Arg	Glu	Asn	Ala	Lys	Ala	Lys	Thr	Asp	His	Gly
		115						120					125		
Ala	Glu	Ile	Val	Tyr	Lys	Ser	Pro	Val	Val	Ser	Gly	Asp	Thr	Ser	Pro
		130					135					140			
Arg	His	Leu	Ser	Asn	Val	Ser	Ser								
		145					150								

【0081】配列番号：21

配列の長さ：144

配列の型：アミノ酸

☆ トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

☆

配列

Thr	Pro	Pro	Lys	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Lys	Ser	Arg	Leu	Gln	Thr	Ala
1			5					10					15		
Pro	Val	Pro	Met	Pro	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Lys	Ser	Lys	Ile	Gly	Ser
			20					25					30		
Thr	Glu	Asp	Leu	Lys	His	Gln	Pro	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Gln	Ile	Val

(22)

41 35 40 45 42
 Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
 50 55 60
 Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
 65 70 75 80
 Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu
 85 90 95
 Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
 100 105 110
 His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly
 115 120 125
 Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro
 130 135 140

【0082】配列番号：22

配列の長さ：135

配列の型：アミノ酸

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

*

配列

Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala
 1 5 10 15
 Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser
 20 25 30
 Thr Glu Asp Leu Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val
 35 40 45
 Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu
 50 55 60
 Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser
 65 70 75 80
 Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu
 85 90 95
 Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr
 100 105 110
 His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly
 115 120 125
 Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser
 130 135

【0083】配列番号：23

配列の長さ：6

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※配列の長さ：148

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

40

配列

Thr Pro Pro Lys Ser Pro

1

5

【0084】配列番号：24

※

配列

Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
 1 5 10 15
 Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asp Leu
 20 25 30
 Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val

35

40

44

45

*

✕ 40

Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Lys	Ser	Arg	Leu	Gln	Thr	Ala	Pro	Val	Pro	Met
1					5				10					15	
Pro	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Lys	Ser	Lys	Ile	Gly	Ser	Thr	Glu	Asp	Leu
			20					25					30		
Lys	His	Gln	Pro	Gly	Gly	Gly	Lys	Val	Gln	Ile	Val	Tyr	Lys	Pro	Val
			35				40					45			
Asp	Leu	Ser	Lys	Val	Thr	Ser	Lys	Cys	Gly	Ser	Leu	Gly	Asn	Ile	His
	50					55				60					
His	Lys	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Glu	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp

(24)

45
 65 70 75 80
 Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr
 85 90 95
 His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr
 100 105 110
 Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val
 115 120 125
 Tyr Lys Ser
 130

【0087】配列番号：27

配列の長さ：18

配列の型：アミノ酸

10 * トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

*

配列

Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val
 1 5 10 15
 Ser Ser

【0088】配列番号：28

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

※配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

20 起源

生物名：ウシ

配列

Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro
 1 5 10

配列

Ala His Pro Trp Thr Lys
 1 5

【0089】配列番号：29

配列の長さ：10

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

【0091】配列番号：31

配列の長さ：25

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

30 起源

生物名：ウシ

配列

Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser
 1 5 10

【0090】配列番号：30

配列の長さ：6

※

配列

Val Thr Thr Val Val Ala Thr Pro Gly Gln Gly Pro Asp Arg Pro Gln
 1 5 10 15

Glu Val Ser Tyr Thr Asp Thr Xaa Phe
 20 25

Xaa：未同定のアミノ酸 40

【0092】配列番号：32

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

★配列の種類：ペプチド

起源

生物名：ウシ

★

配列

Val Ile Gly Asn Gly Ser Phe Gly Val Val Tyr Gln Ala Lys
 1 5 10

【0093】配列番号：33

配列の長さ：21

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

50 起源

(25)

47

48

生物名：ウシ

配列

Gln Thr Leu Pro Val Ile Tyr Val Gln Ile Glu Tyr Gln Pro Val Asp
 1 5 10 15

Pro Xaa Ala Xaa His

20

Xaa : 未同定のアミノ酸

【0094】配列番号：34

* 配列の種類：ペプチド

配列の長さ：25

起源

配列の型：アミノ酸

10 生物名：ウシ

トポロジー：直鎖状

*

配列

Leu Pro Asn Gly Arg Asp Pro Ala Leu Phe Asn Phe Thr Thr Gln Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Xaa Asn Pro Pro Leu Ala Thr

20

25

Xaa : 未同定のアミノ酸

【0095】配列番号：35

※配列の種類：ペプチド

配列の長さ：29

起源

配列の型：アミノ酸

20 生物名：ウシ

トポロジー：直鎖状

※

配列

Val Phe Arg Pro Arg Thr Pro Pro Glu Ala Ile Ala Leu Leu Ser Arg
 1 5 10 15

Leu Leu Glu Tyr Thr Pro Pro Ala Arg Leu Thr Pro Thr

20

25

【0096】配列番号：36

★配列の種類：ペプチド

配列の長さ：30

起源

配列の型：アミノ酸

生物名：ウシ

トポロジー：直鎖状

★30

配列

Val Phe Arg Pro Arg Thr Pro Pro Glu Ala Ile Ala Leu Leu Ser Arg
 1 5 10 15

Leu Leu Glu Tyr Thr Pro Pro Ala Arg Leu Tyr Pro Leu Ala

20

25

30

【0097】配列番号：37

☆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：23

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

☆ 配列の種類：他の核酸（センスプライマー）

配列

ACN CCN CCN GAG GCN ATW GCN YT 23

N : イノシン

W : A or T

Y : C or T

【0098】配列番号：38

◆鎖の数：一本鎖

配列の長さ：20

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

◆ 配列の種類：他の核酸（アンチセンスプライマー）

配列

CTY ATR TGN GGN GGN CGN KC 20

N : イノシン

Y : T or C

R : A or G

K : G or T

【0099】配列番号：39

鎖の数：一本鎖

配列の長さ：56

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

50 配列の種類：他の核酸

(26)

49

50

配列

ACG CCG CCG GAG GCA GTC GCG CTT TGT AGC CGT CTG CTG GAG TAT ACC 48
 CCC CCG GC 56

【0100】配列番号：40

配列の長さ：41

配列の型：核酸

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸（アンチセンスプライマー）

配列

CTY CGN TAG CGN GAA ACA TCG GCA GAC GAC CTC ATA TGN GG 41
 N：イノシン Y：T or C

【0101】配列番号：41

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

10 ※ 配列の特徴

特徴を表す記号：modified-site（リン酸化）

存在位置：5

※ 特徴を決定した方法：E

配列

Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg
 1 5 10

【0102】配列番号：42

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

★ 配列の特徴

特徴を表す記号：modified-site（リン酸化）

存在位置：8

★ 特徴を決定した方法：E

配列

Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg
 1 5 10

【0103】配列番号：43

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

☆ 配列の特徴

特徴を表す記号：modified-site（リン酸化）

存在位置：5, 8

☆ 30 特徴を決定した方法：E

配列

Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg
 1 5 10

【0104】配列番号：44

配列の長さ：12

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

◆ 配列の特徴

特徴を表す記号：modified-site（リン酸化）

存在位置：10

◆ 特徴を決定した方法：E

配列

Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg
 1 5 10

【0105】配列番号：45

配列の長さ：15

配列の型：アミノ酸

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

*

配列

Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 1 5 10 15

【0106】配列番号：46

配列の長さ：34

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

50

(27)

51 52
 配列
 Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15
 Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu
 20 25 30
 Pro Lys

【0107】配列番号：47

配列の長さ：55

配列の型：アミノ酸

* トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

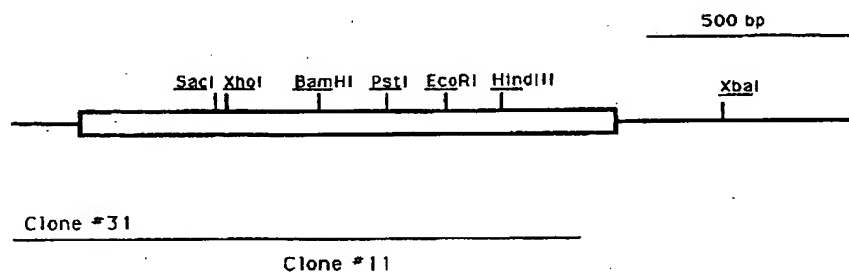
*
 配列 10
 Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val
 1 5 10 15
 Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly
 20 25 30
 Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu
 35 40 45
 Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys
 50 55

【図面の簡単な説明】

す図面である。

【図1】 タウプロテインキナーゼ I の制限酵素地図を表 20

【図1】



【手続補正書】

【提出日】平成5年10月1日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正内容】

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、PHFの蓄積がアルツハイマー病脳でニューロンの変性、引き続いて死を誘導しているものと考え、PHFの蓄積の原因となるタウ蛋白の異常リン酸化に相当する反応を試験管内 (in vitro) で遂行する方法を明らかにすることによって、アルツハイマー病の治療および予防の手段を得ようとするものであり、さらにはこうしたリン酸化の異常に起因するその他の疾患の治療および予防の

手段を得ようとするものである。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正内容】

【0010】かくして得られるラット由来のタウプロテインキナーゼ I の全一次構造は、例えば、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列で表される。なお、かかるラット由来のタウプロテインキナーゼ I の全一次構造は、GSK-3β (グリコゲン シンターゼ キナーゼ 3β) として知られる酵素 (J. R. Woodgett, The EMBO J., 9 (8), 2431-2438 (1990)) と一致することが確認された。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正内容】

【0012】本発明において基質となるタウ蛋白質は、哺乳動物の脳組織から、例えば井原らの方法(J. Biochem., 86, 587-590 (1979))やGrundke-Iqbalらの方法(J. Biol. Chem., 261, 6084-6089 (1986))に従って抽出、精製することができる。さらにその全一次構造は、上記タウプロテインキナーゼIと同様の手法により決定することができる。かくして得られるタウ蛋白質の全一次構造は、ヒト由来のものとして例えば配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で表されるもの等が挙げられる(Goedert et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4051-4055 (1988))。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正内容】

【0015】これは、タウプロテインキナーゼIIがS/T-P(セリン/スレオニン-プロリン)配列を認識する酵素であり、プロリンのN末端側の隣位に位置するセリンおよび/またはスレオニンを特異的にリン酸化する性質によるものである。ところが、こうして部分的にリン酸化したタウ蛋白質は、前述の抗p_{tau}抗体とは反応しなかった。一方、上記のように脳組織から抽出、精製されたタウ蛋白質をアルカリフォスファターゼで処理することにより脱リン酸化してしまうと、本発明のリン酸化反応は認められるほどには進行せず、これに対し、脳組織から抽出、精製したタウ蛋白質またはタウプロテインキナーゼIIを用いて部分的にリン酸化したタウ蛋白質を基質とすると、本発明のリン酸化反応が進行することが確認された(後述の実施例参照)。以上の事実から、タウ蛋白質のリン酸化反応は以下のような経路で進行しているものと考えられた。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正内容】

【0032】またタウ蛋白質の部分ペプチドは、メリフィールドらの固相合成法(J. Am. Chem. Soc., 85, 2149-2154 (1964))により、Biosearch モデル9500等のペプチド合成機等を用いて合成することができる。タウ蛋白質を脱リン酸化する方法としては、例えばpH8.0の1M トリス塩酸緩衝液中で、ウシ小腸アルカリフォスファ

ターゼ(シグマ社 typeVII-NT)を添加して、37℃で5~8時間程度反応させ、タウ蛋白質を脱リン酸化することができる。アルカリフォスファターゼは、反応終了後に10分間程度の加熱処理して失活させればよい。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

【補正内容】

【0042】以下の操作は、0.02% Tween20、10%グリセロールの存在下で行った。

(2) 硫安分画

上記(1)で得た微小管蛋白質をRBで希釈して蛋白質濃度を10mg/mlとし、硫安の粉末を加えて35%飽和硫安液とし30分間放置した後、20000Gで20分間遠心分離して上清を採取した。この上清に再び硫安の粉末を加えて50%飽和硫安液として30分間放置した後、20000Gで20分間遠心分離して得られた沈澱物をRBに溶解し、RBに透析して硫安画分を得た。

(3) フォスフォセルロースカラムクロマトグラフィー
上記(2)で得た硫安画分に、50%グリセロールを含むRBを1/4容加えた。これを硫安画分の蛋白質30mg当たり1mlのP11セルロース(ワットマン社製)を含み、予めPCで平衡化した、P11セルロースのカラムにチャージし、カラムの5倍容の0.1M NaCl-PCでカラムを洗い、引き続いて0.1から0.8M NaCl-PCの直線濃度勾配の展開液をカラムに流し、0.2から0.4M NaClで溶出するPC画分を採取した。

(4) ゲル濾過

上記(3)で得たPC画分を、アミコンPM-10膜の限外濾過装置で蛋白質濃度5mg/ml以上に濃縮し、これを予め0.3M NaCl-RB緩衝液で平衡化したG3000SWカラム(東ソー社製;シリカゲルカラム、21mm×60cm)にチャージし、2ml/分の流速で流通させてゲル濾過を行った。タウプロテインキナーゼ画分(分子量5万の画分)を採取し、アミコンPM-10膜の限外濾過装置で濃縮した。

(5) ハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー

上記(4)で得た画分を、予め12mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH6.8)で平衡化したハイドロキシアパタイトカラム(東燃社製;7.5mm×100mm)にチャージし、12から400mMのリン酸ナトリウム緩衝液の直線濃度勾配10mlで展開し、150mMの濃度で溶出するHA画分を採取した。

(6) S-セファロースカラムクロマトグラフィー

上記(5)の画分をPCで透析し、予めPCで平衡化したS-セファロースカラム(ファルマシア社製;5mm×

(29)

20mm) にチャージし、PCとSBの直線勾配7.5ml、続いてSB中で0から200mM NaClの直線濃度勾配5mlで展開し、150mMの濃度で溶出するS1画分および50mMの濃度で溶出するS2画分を採取した。S2画分はRBで透析して、タウプロテインキナーゼI I画分とした。

【(7) ヘパリンカラムクロマトグラフィー】

上記S1の画分を20mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.6)で平衡化したTSKゲル AF-ヘパリンカラム(東ソー社製; 4mm×8mm)にチャージし、20mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.6)中で、0から200mM NaClの直線濃度勾配4mlで展開し、80mM NaClで溶出するヘパリン画分を採取した。この画分をRBに透析して、タウプロテインキナーゼI I画分とした。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0052

【補正方法】変更

【補正内容】

【0052】更に配列表の配列番号39に示す配列をもとに、新たに41ヌクレオチドのアンチセンスプライマー(配列表の配列番号40)を合成し、5'末端を³²Pで標識してcDNAクローンをスクリーニングするためのプローブとした。cDNAライブラリーは市販のもの(Clontech社)を利用した。これはラット大脳皮質のmRNAをランダムプライミング法で合成したcDNAをλgt11に挿入したものである。常法に従い、48℃でハイブリダイズし×1SSC(0.3M塩化ナトリウム および 0.03M クエン酸ナトリウムからなる緩衝液)、35℃で洗浄することにより、約60万のクローンから1個の陽性クローン(#31)を得た。#31は約1.3kbのインサートを持ち、それをpUC19にサブクローニングしてDNA配列を求めた。この配列の同一フレーム上に上記8個のペプチド全てのアミノ酸配列が確認されたが、3'末端側には終止コドンは存在しなかった。そこでこの配列の一部をプローブとして用い、新たなクローン(#11)を得た。#11のインサートは、クローン#31の配列の途中から始まり、約1.2kbの大きさであった。両者の配列を連結し、約420アミノ酸残基のオープンリーディングフレーム(ORF)の存在を確認した。かかるアミノ酸配列および塩基配列を配列表の配列番号1に、制限酵素地図を図1に示す。

実施例1

ウシの脳から抽出精製したタウ蛋白質をタウプロテインキナーゼI Iでリン酸化した後、1M尿素、20mMメチルアミンおよび50mMリン酸ナトリウムを含むpH8.5の緩衝液中で、タウ蛋白質の1/20(重量比)のエンドプロテアーゼ Lys-C(Boehringer

er Mannheim GmbH)を添加して、37℃で2時間酵素消化した。生成したペプチドは、逆相高速カラムクロマトグラフィーで分離した。このときカラムはC₄カラム(Bakerbond, 4.6mm×5cm)を使用し、溶出液としては0.1%トリフルオロ酢酸中、アセトニトリルとイソプロパノールの混合溶媒(混合比3:7)を全溶媒の0%から70%まで直線勾配で増加させた。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0053

【補正方法】変更

【補正内容】

【0053】次にタウ蛋白質を[γ-³²P]ATP共存下でリン酸化した。³²Pで標識されたペプチドのピークは3つ検出され、溶出順にpK1、pK2およびpK3と名付けた(「p」はリン酸化されたことを示す)。非放射性のATPを用いても同様にタウ蛋白質をリン酸化した。分取されたpK1、pK2およびpK3のそれぞれの画分は、気相プロテインシーケンサー(Applied Biosystems 477A)を用いてペプチドのアミノ酸配列を分析した。その結果、K1は配列表の配列番号2に記載のヒト由来のタウ蛋白質のアミノ酸配列で168番目のバリンから182番目のリジンに至るペプチド、K2は133番目のセリンから166番目のリジンに至るペプチド、K3は307番目のセリンから349番目のリジンに至るペプチドであり(Goedertら、Neuron、3、519-526(1989))、pK1、pK2およびpK3のそれぞれについてリン酸化部位も以下のように決定された。すなわち、アミノ酸配列分析においてリン酸化セリンはDTT存在下でPTH-デヒドロアラニンを経由してDTT付加物を生成し、PTH-セリンを生じないことが知られている(Meyerら、FEBS Lett.、204、61-66(1986))。同様にリン酸化スレオニンでもDTT付加物を生ずるが、PTH-スレオニンを生成しない。これによってpK1では配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列における177番目のセリンが、pK2では144番目のセリンと147番目のスレオニンが、pK3では315番目のセリンがリン酸化されていることが判明した。

【手続補正9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0057

【補正方法】変更

【補正内容】

【0057】以上の結果から、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において144番目のセリン、147番目のスレオニン、177番目のセリンおよび315番目のセリンから選ばれる1以上のアミノ酸がリン酸化さ

(30)

れたタウ蛋白質を基質としてタウプロテインキナーゼIを作用させると、PHF中の異常リン酸化と同様なリン酸化が進行することがわかった。

実施例2

一次構造が配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列で表されるタウ蛋白質をタウプロテインキナーゼIでリン酸化した後、さらに〔 γ - 32 P〕ATP存在下でタウプロテインキナーゼIでリン酸化してから、エンドプロテアーゼLys-Cで酵素消化した。実施例1と同様にして 32 Pを取り込んだペプチド・ピークを同定し、さらに実施例1と同様にして相当する非標識ペプチドを分取した。これらのペプチドはアミノ酸配列分析により、実施例1のpK1、pK2およびpK3に相当することが確認され、これらがタウプロテインキナーゼIによってさらにリン酸化されたものであると結論した。これらのペプチドを、それぞれppK1、ppK2およびppK3と呼ぶ。それぞれのアミノ酸配列分析において、実施例1と同様にPTH-アミノ酸がセリンまたはスレオニンの脱水物のPTH誘導体のDTT付加物であるか否かでリン酸化部位を判定したところ、ppK1においては配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列における173番目のスレオニン、ppK2では141番目のセリン、ppK3では307番目のセリンと324番目のセリンがタウプロテインキナーゼIによってリン酸化されたアミノ酸であることが判明した。

実施例3

配列表の配列番号45に記載のアミノ酸配列で表されるペプチドを合成し、〔 γ - 32 P〕ATP存在下でタウプロテインキナーゼIでリン酸化したが、該ペプチドには 32 Pは取り込まれなかった。しかし、このペプチドをタウプロテインキナーゼIで予めリン酸化することにより、タウプロテインキナーゼIでリン酸化することができた。タウプロテインキナーゼIによるリン酸化の前後のペプチドのアミノ酸配列分析を比較したところ、配列表の配列番号45に記載のアミノ酸配列において6番目のスレオニンに相当するPTH-アミノ酸がリン酸化前ではPTH-スレオニンであったのに対し、リン酸化後ではPTH-デヒドロ- α -アミノ酪酸のDTT付加物であった。なお、同配列において10番目のセリンに相当するPTH-アミノ酸は、いずれもPTH-デヒドロアラニンのDTT付加物であった。

配列

Val	Thr	Thr	Val	Val	Ala	Thr	Pro	Gly	Gln	Gly	Pro	Asp	Arg	Pro	Gln
1					5				10					15	
Glu	Val	Ser	Tyr	Thr	Asp	Xaa	Xaa	Xaa							
				20				25							

Xaa : 未同定のアミノ酸

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0093

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0058

【補正方法】変更

【補正内容】

【0058】この結果から、配列表の配列番号45に記載のアミノ酸配列で表されるペプチドのタウプロテインキナーゼIによるリン酸化には、タウプロテインキナーゼIによる10番目のセリンのリン酸化が必要であり、かつタウプロテインキナーゼIによるリン酸化の部位は6番目のスレオニンであることがわかった。

実施例4

配列表の配列番号46に記載のアミノ酸配列で表されるペプチドを合成し、〔 γ - 32 P〕ATP存在下でタウプロテインキナーゼIでリン酸化したが、該ペプチドには 32 Pは取り込まれなかった。しかし、このペプチドをタウプロテインキナーゼIで予めリン酸化することにより、タウプロテインキナーゼIでリン酸化することができた。タウプロテインキナーゼIによるリン酸化の前後のペプチドのアミノ酸配列分析を比較したところ、配列表の配列番号46に記載のアミノ酸配列において9番目のセリンに相当するPTH-アミノ酸がリン酸化前ではPTH-セリンであったのに対し、リン酸化後ではPTH-デヒドロアラニンのDTT付加物であった。なお、同配列において12番目のセリンに相当するPTH-アミノ酸は、いずれもPTH-デヒドロアラニンのDTT付加物であり、15番目のスレオニンに相当するPTH-アミノ酸は、いずれもPTH-デヒドロ- α -アミノ酪酸のDTT付加物であった。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0091

【補正方法】変更

【補正内容】

【0091】配列番号：31

配列の長さ：25

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

起源

生物名：ウシ

【補正方法】変更

【補正内容】

【0093】配列番号：33

(31)

配列の長さ：21
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド
起源
生物名：ウシ

配列

Xaa Thr Leu Pro Val Ile Tyr Val Xaa Xaa Xaa Tyr Gln Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

20

Xaa：未同定のアミノ酸

【手続補正13】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0094
【補正方法】変更
【補正内容】
【0094】配列番号：34

配列の長さ：25
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：ウシ

配列

Leu Pro Asn Gly Arg Asp Thr Pro Ala Leu Phe Asn Xaa Thr Thr Gln
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa

20

25

Xaa：未同定のアミノ酸

【手続補正14】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0095
【補正方法】変更
【補正内容】
【0095】配列番号：35

配列の長さ：29
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：ウシ

配列

Val Phe Arg Pro Arg Thr Pro Pro Glu Ala Ile Ala Leu Leu Xaa Arg
1 5 10 15

Xaa Leu Glu Tyr Thr Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Thr Pro Xaa

20

25

Xaa：未同定のアミノ酸

【手続補正15】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0096
【補正方法】変更
【補正内容】
【0096】配列番号：36

配列の長さ：30
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
起源
生物名：ウシ

配列

Val Phe Arg Pro Arg Thr Pro Pro Glu Ala Ile Ala Leu Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Leu Leu Glu Tyr Thr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

20

25

30

Xaa：未同定のアミノ酸

【手続補正16】
【補正対象書類名】明細書
【補正対象項目名】0097
【補正方法】変更
【補正内容】

【0097】配列番号：37

配列の長さ：23
配列の型：核酸
鎖の数：一本鎖
トポロジー：直鎖状

(32)

配列の種類：他の核酸（センスプライマー）

配列

ACN CCN CCN GAG GCN ATH GCN YT 23

N : イノシン H : A or C or T Y : C or T

【手続補正17】

配列の長さ：20

【補正対象書類名】明細書

配列の型：核酸

【補正対象項目名】0098

鎖の数：一本鎖

【補正方法】変更

トポロジー：直鎖状

【補正内容】

配列の種類：他の核酸（アンチセンスプライマー）

【0098】配列番号：38

配列

CKN GCN GGN GGN GTR TAY TC 20

N : イノシン Y : T or C R : A or G K : G or T

フロントページの続き

(72) 発明者 今堀 和友

東京都町田市南大谷字11号916番地の2

株式会社三菱化成生命科学研究所内